

明細書

K 0 1 - 0 5 0 9 物質およびその製造法

技術分野

本発明は、細菌の I I I 型分泌機構を阻害する K 0 1 - 0 5 0 9 物質およびその製造法に関し、該 K 0 1 - 0 5 0 9 物質は K 0 1 - 0 5 0 9 - A 1 物質及び／又は K 0 1 - 0 5 0 9 - A 2 物質からなる抗感染治療薬、あるいは予防薬として有用な物質に関するものである。

背景技術

細菌の病原因子を菌体外に放出する機能を持つ I I I 型分泌機構は、例えばサルモネラ (Salmonella) 属、エルシニア (Yersinia) 属、シュードモナス (Pseudomonas) 属、赤痢菌 (Shigella)、腸管病原性大腸菌 (Enteropathogenic E. coli、以下 EPEC と略称することもある)、腸管出血性大腸菌 (Enterohaemorrhagic E. coli)、そしてボルデテラ (Bordetella) 属に高度に保存されていることが既に報告されている (Microbiology and molecular biology reviews, June, 1998, p 381)。

前述の I I I 型分泌機構を保持する細菌は、この分泌機構を通して病原因子を菌体外に放出し、放出された病原因子の一部は宿主細胞へと移行すること、さらに宿主細胞に移行した病原因子は細菌の病原性に大きく関与していることが既に報告されている (Microbiology and Molecular Biology Reviews, June 1998, p 382～)。

一方、I I I 型分泌機構によって分泌される蛋白質 (以下 I I I 型分泌蛋白質と略称することもある) を欠損させた EPEC 株においては、病原性を消失す

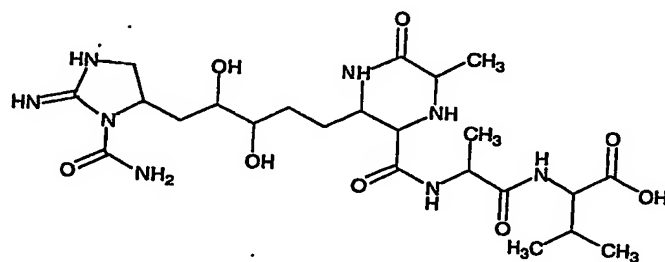
ることがウサギの感染実験 (J. Exp. Med. Volume 188, Number 10, November 16, 1998 p1907-1916)、及びヒトをボランティアとした感染実験 (Infection and immunity, June 2000, p3689-3695) により明らかにされている。このような事実から、III型分泌機構ならびにその分泌蛋白質の機能を阻害する物質は、細菌を死滅させるのではなく、その病原性のみを消失させるという新しい概念の抗感染治療薬、あるいは予防薬としてその効果が期待される。

発明の開示

かかる実情において、病原細菌に対してその病原性を消失させる新しい抗感染薬を見いだすことが本発明が解決しようとする課題である。

本発明者らは上記のごとき課題を解決すべく微生物の生産する代謝産物について種々研究を続けた結果、奄美大島の土壌より新たに分離されたK01-0509菌株の培養物中にIII型分泌機構阻害活性を有する物質が産生されることを見いだした。次いで、該培養物中からIII型分泌機構阻害活性を示す物質を分離精製した結果、後記の式 [I] および [II] で示される化学構造を有する物質を見いだした。このような化学構造を有する物質は従来まったく知られていないことから、各々本物質をK01-0509-A1物質およびK01-0509-A2物質と称することにし、その総称をK01-0509物質と称することにした。

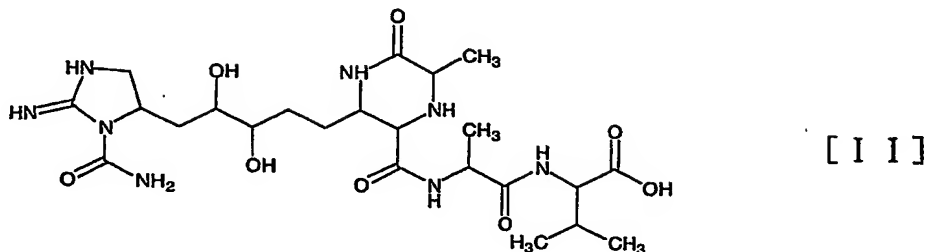
本発明は、かかる知見に基づいて完成されたものであって、下記式 [I]



[I]

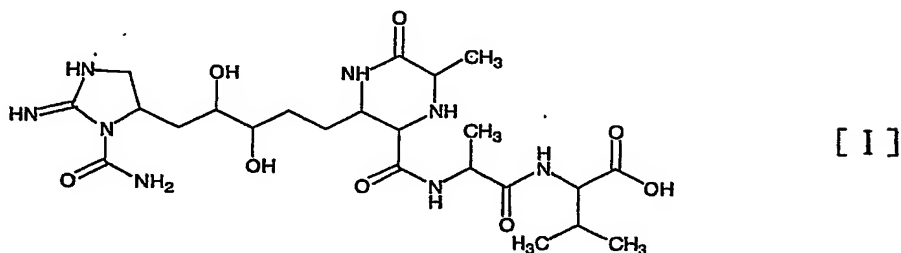
で表されるK 0 1 - 0 5 0 9 - A 1 物質を提供するものである。

本発明は下記式 [I I]

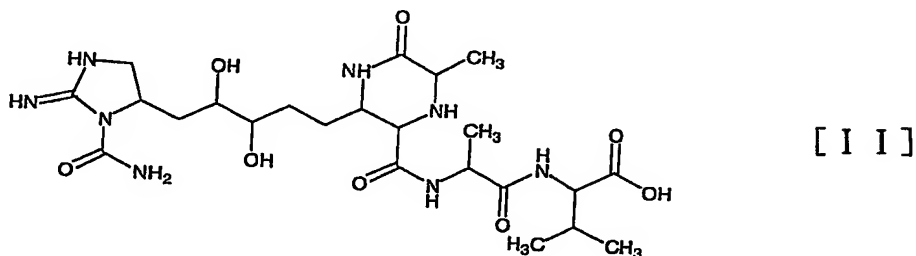


で表されるK 0 1 - 0 5 0 9 - A 2 物質 (A 1 物質の立体異性体) を提供するものである。

本発明は特に下記式 [I]



で表されるK 0 1 - 0 5 0 9 - A 1 物質及び特に下記式 [I I]



で表されるK 0 1 - 0 5 0 9 - A 2 物質 (A 1 物質の立体異性体) からなるK 0 1 - 0 5 0 9 組成物を提供するものである。

本発明は更に、ストレプトミセス属に属し、K 0 1 - 0 5 0 9 - A 1 物質を生産する能力を有する微生物を培地で培養し、培養液中にK 0 1 - 0 5 0 9 - A 1 物質を蓄積せしめ、該培養物からK 0 1 - 0 5 0 9 - A 1 物質を採取するK 0 1 - 0 5 0 9 - A 1 物質の製造法を提供するものである。

本発明は更に、ストレプトミセス属に属し、K 0 1 - 0 5 0 9 - A 2 物質を生産する能力を有する微生物を培地で培養し、培養液中にK 0 1 - 0 5 0 9 - A 2 物質を蓄積せしめ、該培養物からK 0 1 - 0 5 0 9 - A 2 物質を採取するK 0 1 - 0 5 0 9 - A 2 物質の製造法を提供するものである。

本発明は更に、ストレプトミセス属に属し、K 0 1 - 0 5 0 9 - A 1 物質およびK 0 1 - 0 5 0 9 - A 2 物質を生産する能力を有する微生物を培地で培養し、培養液中にK 0 1 - 0 5 0 9 - A 1 物質およびK 0 1 - 0 5 0 9 - A 2 物質を蓄積せしめ、該培養物からK 0 1 - 0 5 0 9 - A 1 物質およびK 0 1 - 0 5 0 9 - A 2 物質からなる組成物の製造法を提供するものである。

本発明は更に、ストレプトミセス属に属し、K 0 1 - 0 5 0 9 - A 1 物質を生産する能力を有する微生物が、ストレプトミセス・エスピー K 0 1 - 0 5 0 9 (S t r e p t o m y c e s s p. K 0 1 - 0 5 0 9) F E R M B P - 0 8 5 0 4 であるK 0 1 - 0 5 0 9 - A 1 物質の製造法を提供するものである。

本発明は更に、ストレプトミセス属に属し、K 0 1 - 0 5 0 9 - A 2 物質を生産する能力を有する微生物が、ストレプトミセス・エスピー K 0 1 - 0 5 0 9 (S t r e p t o m y c e s s p. K 0 1 - 0 5 0 9) F E R M B P - 0 8 5 0 4 であるK 0 1 - 0 5 0 9 - A 2 物質の製造法を提供するものである。

本発明は更に、ストレプトミセス属に属し、K 0 1 - 0 5 0 9 - A 1 物質およびK 0 1 - 0 5 0 9 - A 2 物質を生産する能力を有する微生物が、ストレプトミセス エスピー K 0 1 - 0 5 0 9 (S t r e p t o m y c e s s p. K 0 1 - 0 5 0 9) F E R M B P - 0 8 5 0 4 であるK 0 1 - 0 5 0 9 - A 1 物質およびK 0 1 - 0 5 0 9 - A 2 物質からなる組成物の製造法を提供するものである。

本発明は更に、ストレプトミセス・エスピー K 0 1 - 0 5 0 9 (S t r e p t o m y c e s s p. K 0 1 - 0 5 0 9) F E R M B P - 0 8 5 0 4 である微生物を提供するものである。

前記の式 [I] および [I I] で表される本発明のK 0 1 - 0 5 0 9 - A 1

物質およびK 0 1 - 0 5 0 9 - A 2 物質またはこれら物質からなる組成物を生産する能力を有する微生物（以下「K 0 1 - 0 5 0 9 物質生産菌」と称する）は、ストレプトミセス属（*Streptomyces*）に属するが、例えば本発明者らが新たに分離したストレプトミセス・エスピー（*Streptomyces* sp.）K 0 1 - 0 5 0 9 菌株が、本発明において最も有効に使用される菌株の一例である。

本発明のストレプトミセス・エスピー（*Streptomyces* sp.）K 0 1 - 0 5 0 9 菌株の菌学的性状を示すと、以下のとおりである。

（I）形態的性質

栄養菌糸は各種寒天培地上でよく発達し、分断は観察されない。気菌糸はイースト・麦芽エキス寒天培地やグリセロール・アスパラギン寒天培地で豊富に着生し、ホワイトからグレーの色調を呈する。顕微鏡下の観察では、気菌糸上に20ヶ以上の胞子の連鎖が認められ、その形態は直線状で、胞子の大きさは約0.6～0.8×1.0～1.8 μmの円筒状である。胞子の表面は平滑で、菌核、胞子のうおよび遊走子は見いだされない。

（II）各種培地上での性状

イー・ビー・シャーリング（E. B. Shirling）とデー・ゴットリーブ（D. Gottlieb）の方法（インターナショナル・ジャーナル・オブ・システマティック・バクテリオロジー、16巻、313頁、1966年）によって調べた本生産菌の培養性状を次表に示す。色調は標準色として、カラー・ハーモニー・マニュアル第4版（コンテナー・コーポレーション・オブ・アメリカ・シカゴ、1958年）を用いて決定し、色票名とともに括弧内にそのコードを併せて記した。以下は特記しない限り、27℃、2週間目の各培地における観察の結果である。

培養性状

 シュークロース・硝酸塩寒天培地

生	育	良好に生育、ライトアンバー (3 i c)
裏	面	ライトアンバー (3 i c)
気 菌 糸		中程度に着生、ホワイト (a) ～グレー (h)
可溶性色素		産生しない

グルコース・アスパラギン寒天培地

生	育	良好に生育、パールピンク (3 c a)
裏	面	パールピンク (3 c a)
気 菌 糸		着生しない
可溶性色素		産生しない

グリセロール・アスパラギン寒天培地 (I S P)

生	育	良好に生育、ライトアンバー (3 i c)
裏	面	ライトアンバー (3 i c)
気 菌 糸		豊富に着生、ホワイト (a) ～グレー (f)
可溶性色素		産生しない

スターチ・無機塩寒天培地 (I S P)

生	育	良好に生育、ライトアンバー (3 i c)
裏	面	ライトタン (3 g c) ～ライトアンバー (3 i c)
気 菌 糸		中程度に着生、ホワイト (a) ～グレー (h)
可溶性色素		産生しない

チロシン寒天培地 (I S P)

生	育	良好に生育、パンブー (2 g c)
---	---	--------------------

裏面	バンブー (2 g c)
気菌糸	中程度に着生、ホワイト (a)
可溶性色素	産生しない

オートミール寒天培地 (ISP)

生育	良好に生育、ライトアンバー (3 i c)
裏面	ライトタン (3 g c) ~ オレンジラスト (4 p e)
気菌糸	中程度に着生、ホワイト (a) ~ ダークコバルト グレー (2 i h)
可溶性色素	産生しない

イースト・麦芽エキス寒天培地 (ISP)

生育	良好に生育、アンバー (3 l c)
裏面	ライトアンバー (3 i c) ~ ダークラゲージタン (4 p g)
気菌糸	豊富に着生、ホワイト (a) ~ グレー (g)
可溶性色素	産生しない

栄養寒天培地

生育	良好に生育、パールピンク (3 c a)
裏面	パールピンク (3 c a)
気菌糸	着生しない
可溶性色素	産生しない

ペプトン・イースト・鉄寒天培地 (ISP)

生育	良好に生育、バンブー (2 f b)
裏面	バンブー (2 f b)

気 菌 糸	貧弱に着生、ライトアイボリー (2 c a)
可溶性色素	産生しない

グルコース・硝酸塩寒天培地

生 育	中程度に生育、ブライト (3 i a)
裏 面	オレンジ (4 l a)
気 菌 糸	着生しない
可溶性色素	産生しない

グリセロール・リンゴ酸カルシウム寒天培地

生 育	良好に生育、バンブー (2 f b)
裏 面	パールピンク (3 c a)
気 菌 糸	貧弱に着生、ホワイト (a)
可溶性色素	産生しない

グルコース・ペプトン寒天培地

生 育	良好に生育、ライトアイボリー (2 c a)
裏 面	パールピンク (3 c a)
気 菌 糸	着生しない
可溶性色素	産生しない

(III) 生理学的諸性質

(1) メラニン色素の生成

(イ) チロシン寒天	陰性
(ロ) ペプトン・イースト・鉄寒天	陰性
(ハ) トリプトン・イースト液	陽性

(二) 単純ゼラチン培地 (21～23℃)	擬陽性
(2) 硝酸塩の還元	陰性
(3) ゼラチンの液化 (21～23℃) (単純ゼラチン培地)	陰性
(4) スターチの加水分解	陽性
(5) 脱脂乳の凝固 (37℃)	陽性
(6) 脱脂乳のペプトン化 (37℃)	陽性
(7) 生育温度範囲	10～38℃
(8) 炭素源の利用性 (プリドハム・ゴトリーブ寒天培地)	
利用する : D-グルコース、L-アラビノース	
利用しない : D-キシロース、D-マンニトール、L-ラムノース、 D-フラクトース、myo-イノシトール、ラフィノース、 メリビオース、シュークロース	
(9) セルロースの分解	陰性

(IV) 細胞壁組成

細胞壁のジアミノピメリン酸はLL型であり、主要メナキノンはMK-9 (H₈) である。

(V) 結論

以上、本菌の菌学的性状を要約すると次のとおりである。細胞壁中のジアミノピメリン酸はLL型、主要メナキノンはMK-9 (H₈) とMK-9 (H₈) である。孢子連鎖の形態は直鎖状で、長い孢子鎖を形成し、孢子の表面は平滑である。培養上の諸性質としては、栄養菌糸は褐色の色調を呈し、気菌糸はホワイトからグレー系の色調を呈する。トリプトン・イースト液でメラニン色素を産生する。

これらの結果から、バーギーズ・マニュアル・オブ・システマティック・バクテリオロジー、4巻、1989年に基づくストレプトミセス属に属する菌種で

あると考えられる。

本菌株は特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブタペスト条約に基づき、ストレプトミセス・エスピー (*Streptomyces* sp.) K 0 1 - 0 5 0 9 として、日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6 (郵便番号305-8566) [AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566 Japan] に所在する独立行政法人産業技術相好研究所 特許生物寄託センター [International Patent Organism Depositary National Institute of Advanced Industrial Science and Technology] に寄託されている。寄託日は平成15年 (2003) 10月6日、受託番号はFERM BP-08504が付与された。

本発明で使用されるK 0 1 - 0 5 0 9 物質生産菌としては、前述のストレプトマイセス エスピー K 0 1 - 0 5 0 9 菌株が好ましい例として挙げられるが、菌は一般的性状として菌学上の性状は極めて変異し易く、一定したものではなく、自然的にあるいは通常行われる紫外線照射または変異誘導体、例えばN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン、エチルメタンサルホネート等を用いる人工的変異手段により変異することは周知の事実であり、このような人工変異株は勿論、自然変異株も含め、ストレプトミセス属に属し、前記の式 [I] 及び [II] で表されるK 0 1 - 0 5 0 9 物質またはその物質の組成物を生産する能力を有する菌株はすべて本発明に使用することができる。

本発明のK 0 1 - 0 5 0 9 物質を製造するにあたっては、先ずストレプトミセス属に属するK 0 1 - 0 5 0 9 物質生産菌を培地に培養することにより行われる。本発明のK 0 1 - 0 5 0 9 物質生産に適した栄養源としては、微生物が同化し得る炭素源、消化し得る窒素源、さらに必要に応じて無機塩、ビタミン等を含むさせた栄養培地が使用される。炭素源としては、グルコース、フラクトース、

マルトース、ラクトース、ガラクトース、デキストリン、澱粉などの糖類、大豆油等の植物性油脂類が単独または組み合わせて用いられる。

窒素源としては、ペプトン、酵母エキス、肉エキス、大豆粉、綿実粉、コーン・スチープ・リカー、麦芽エキス、カゼイン、アミノ酸、尿素、アンモニウム塩類、硝酸塩類などが単独または組み合わせて用いられる。その他必要に応じてリン酸塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、ナトリウム塩、カリウム塩などの塩類、鉄塩、マンガン塩、銅塩、コバルト塩、亜鉛塩などの重金属塩類やビタミン類、その他K 0 1 - 0 5 0 9物質の生産に好適なものが添加される。

培養するに当たり、発泡の激しいときには、必要に応じて液体パラフィン、動物油、植物油、シリコン油、界面活性剤などの消泡剤を添加してもよい。上記の培養は、上記の栄養源を含有すれば、培地は液体でも固体でもよいが、通常は液体培地を用い、培養するのがよい、少量生産の場合にはフラスコを用いる培養が好適である。

培養を大きなタンクで行う場合は、生産工程において、菌の生育遅延を防止するため、はじめに比較的少量の培地に生産菌を接種培養した後、次に培養物を大きなタンクに移して、そこで生産培養するのが好ましい。この場合、前培養に使用する培地および生産培養に使用する培地の組成は、両者ともに同一であってもよいし、必要があれば両者を変えてもよい。

培養を通気攪拌条件で行う場合は、例えばプロペラやその他機械による攪拌、ファメーターの回転または振とう、ポンプ処理、空気の吹き込みなど既知の方法が適宜使用される。通気用の空気は、滅菌したものを使用する。培養温度は、本K 0 1 - 0 5 0 9物質生産菌が本物質を生産する範囲内で適宜変更し得るが、通常は20～30℃、好ましくは27℃前後で培養するのがよい。培養pHは、通常は5～8、好ましくは7前後で培養するのがよい。培養時間は、培養条件によっても異なるが、通常は3日程度である。

このようにして得られた培養物に蓄積されるK 0 1 - 0 5 0 9物質は、通常は培養上清中に存在する。培養上清から目的とするK 0 1 - 0 5 0 9物質を採取

するには、通常の微生物の培養物から代謝産物を採取するに用いられる手段を単独あるいは任意の順序に組み合わせて、または反復して用いられる。

本K 0 1 - 0 5 0 9 物質を分離、採取するには培養上清から採取すればよい。培養上清を水溶性物質の採取に用いられる公知の方法、例えば吸着クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーなどを組合せ、あるいは繰り返すことにより、本K 0 1 - 0 5 0 9 物質を単離することができる。

次に、本発明のK 0 1 - 0 5 0 9 物質の理化学的性状について説明する。

1. K 0 1 - 0 5 0 9 - A 1 物質

(1) 性状 : 白色粉末

(2) 分子式 : $C_{23}H_{40}N_8O_8$

HRFAB-MS (m/z) $[M+H]^+$

計算値 557.3047、実測値 557.3052

(3) 分子量 : 556

FAB-MS (m/z) で $[M+H]^+ 557$ 、 $[M+Na]^+ 579$ を観測

(4) 紫外部吸収スペクトル

: 水溶液中で測定した紫外部吸収スペクトルは第1図に示すとおりであり、末端吸収を示す。

(5) 赤外部吸収スペクトル

: 臭化カリウム錠剤法で測定した赤外部吸収スペクトルは第2図に示すとおりであり、 $\lambda_{max} 1564$ 、 1682 cm^{-1} に特徴的な吸収極大を示す。

(6) 比旋光度

: $[\alpha]_D^{27} -5.00^\circ$ ($c=0.1$ 、メタノール)

(7) 溶剤に対する溶解性

: 水、ジメチルスルフォキシド (DMSO)、メタノールに可溶。

: アセトニトリル、酢酸エチル、クロロホルム、アセトンに不溶

(8) 塩基性、酸性、中性の区別

: 塩基性物質

(9) アミノ酸分析

: L-アラニン、L-バリン (1 : 1) が存在する。

(10) ^1H -プロトン核磁気共鳴スペクトル (重水中) の測定には、バリアン社製 400 MHz 核磁気共鳴スペクトロメータを用いて測定 (第3図) した。その化学シフト (ppm) は 0.92 (3H)、0.92 (3H)、1.39 (3H)、1.44, 1.55 (3H)、1.57、1.71、1.76、1.77、1.93、2.11、3.48、3.61、3.79、3.97、4.07、4.17、4.23、4.27、4.43、4.44。

(11) ^{13}C -核磁気共鳴スペクトル (重水中) の測定には、バリアン社製 100 MHz 核磁気共鳴スペクトロメータを用いて測定 (第4図) した。その化学シフト (ppm) は 18.2、19.1、20.1、21.1、29.6、30.3、32.5、38.8、52.2、53.1、53.3、53.8、54.0、56.0、62.4、74.1、76.7、158.9、158.9、168.4、172.1、176.6、179.2。

以上のように、K01-0509-A1物質の各種理化学性状やスペクトルデータを詳細に検討した結果、K01-0509-A1物質は式 [I] で表される化学構造であることが決定された。

2. K01-0509-A2物質

(1) 性状 : 白色粉末

(2) 分子式 : $\text{C}_{23}\text{H}_{40}\text{N}_8\text{O}_8$

HRFAB-MS (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$

計算値 557.3047、実測値 557.3023

(3) 分子量 : 556

FAB-MS (m/z) で $[M+H]^+$ 557、 $[M+Na]^+$ 579 を観測

(4) 紫外部吸収スペクトル

: 水溶液中で測定した紫外部吸収スペクトルは第5図に示すとおりであり、末端吸収を示す。

(5) 赤外部吸収スペクトル

: 臭化カリウム錠剤法で測定した赤外部吸収スペクトルは第6図に示すとおりであり、 λ_{max} 1564、1682 cm^{-1} に特徴的な吸収極大を示す。

(6) 比旋光度

: $[\alpha]_D^{25} - 7.4^\circ$ ($c = 0.1$ 、メタノール)

(7) 溶剤に対する溶解性

: 水、ジメチルスルフォキサイド (DMSO)、メタノールに可溶。

: アセトニトリル、酢酸エチル、クロロホルム、アセトンに不溶

(8) 塩基性、酸性、中性の区別

: 塩基性物質

(9) アミノ酸分析

: L-アラニン、L-バリン (1:1) が存在する。

(10) 1H -プロトン核磁気共鳴スペクトル (重水中) の測定には、バリアン社製 400 MHz 核磁気共鳴スペクトロメータを用いて測定した (第7図)。その化学シフト (ppm) は 0.92 (3H)、0.92 (3H)、1.39 (3H)、1.44、1.53 (3H)、1.57、1.71、1.76、1.77、1.93、2.12、3.48、3.61、3.79、3.99、4.07、4.09、4.23、4.27、4.44、4.50。

(11) ^{13}C -核磁気共鳴スペクトル(重水中)の測定には、バリアン社製 100 MHz 核磁気共鳴スペクトロメータを用いて測定(第8図)した。その化学シフト(ppm)は17.0、19.2、20.1、21.1、30.1、30.4、32.6、38.8、52.2、53.2、53.8、54.0、54.9、59.8、62.4、74.2、76.8、158.9、158.9、168.3、172.1、176.6、179.0。

以上のように、K01-0509-A2物質の各種理化学性状やスペクトルデータを詳細に検討した結果、K01-0509-A2物質は式[II]で表される化学構造であることが決定された。

次に、本発明のK01-0509物質の生物学的性状について以下に述べる。K01-0509物質の病原性グラム陰性細菌に対するIII型分泌機構の阻害活性及び抗菌活性は以下の方法で測定した。

(1) 腸管病原性大腸菌III型分泌機構に依存した溶血阻害活性の測定

本活性試験は、大村らによって確立されたバクテリアのタイプIII分泌機構およびその分泌蛋白質の機能を阻害する物質の検出法(国際公開番号WO02/057760A1、対応の米国特許第6586200B2)に従って行った。すなわち、腸管病原性大腸菌CesT欠損株(WO02/057760A1)を、エル・ビー液体培地(エル・ビー・メディア2.5%、フナコシ社製、日本国)5mLに1白金耳植菌し、37℃で12時間静置培養する。その培養液をカザミノ酸含有M9培地〔リン酸水素二ナトリウム0.68%(関東化学社製、日本国)、リン酸二水素カリウム0.3%(和光純薬社製、日本国)、塩化ナトリウム0.05%(関東化学社製、日本国)、塩化アンモニウム0.1%(和光純薬社製、日本国)、グルコース0.4%(和光純薬社製、日本国)、カザミノ酸0.1%(三光純薬社製、日本国)、硫酸マグネシウム0.012%(関東化学社製、日本国)〕に1%植菌して37℃で4時間静置培養する。その培養液を3500rpmで15分間遠心し、得られた菌体ペレットを5mLのカザミノ酸含有

M9培地で再懸濁した。

一方、赤血球溶液は、ヒツジ赤血球（日本生物材料センター、日本国）8 mLに4℃の生理食塩水40 mLを加えて2500 rpm、5分間、4℃で遠心分離することで3回洗浄した後に、赤血球ペレットの重さを測定する。ペレット1 gに対して2 mLの割合でカザミノ酸含有M9培地を加えて懸濁させた。このように調製した大腸菌懸濁液と赤血球懸濁液を等量混合し、この混合液90 μ Lを、あらかじめサンプル5 μ Lおよびカザミノ酸含有M9培地10 μ Lを添加した96穴マイクロプレート（コーニング社製、米国）に添加した。次に、1500 rpmで10分間遠心分離し、これを37℃で90～150分間加温し溶血反応を開始させた。反応後直ちに冷却したPBS（－）（塩化ナトリウム0.8%、（関東化学社製、日本国）、リン酸水素二ナトリウム0.115%（関東化学社製、日本国）、リン酸二水素カリウム0.02%（和光純薬社製、日本国）、塩化カリウム0.02%（関東化学社製、日本国）150 μ Lを加えて懸濁後、1500 rpmで10分間遠心分離した。遠心後上清100 μ Lを新たな96穴マイクロプレートに移し、ヘモグロビンの溶出と自動マイクロプレートリーダー（Bio-Instruments社製、米国）を用いて波長550 nmで吸光度を測定した。溶血阻害活性は次式に従い計算した。

$$\text{溶血阻害活性 (\%)} = 100 - \{ (A - C) / (B - C) \times 100 \}$$

A：サンプルを添加した時のOD550 nm測定値

B：赤血球・腸管病原性大腸菌CesT欠損株混合液のみでのOD550 nm測定値

C：赤血球のみでのOD550 nm測定値

その結果、K01-0509-A1物質の溶血阻害活性はIC₅₀値で4.2 μ g/mL、K01-0509-A2物質のIC₅₀は3.2 μ g/mLと測定され、両物質ともIII型分泌機構を阻害することが明らかとなった。

(2) ペーパーディスク法による腸管病原性大腸菌及び各種検定菌に対する抗菌

活性の測定

検定菌として *Enteropathogenic E. coli* E2348/69 (野性株)、*Bacillus subtilis* ATCC6633、*Micrococcus luteus* ATCC9341、*Escherichia coli* NIHJ、*Xanthomonas compestris* pv. *oryzae* KB88 を用い、培地は栄養寒天培地〔ペプトン 0.5% (極東製薬社製、日本国)、肉エキス 0.5% (極東製薬社製、日本国)、寒天 0.8% (清水食品社製、日本国)、pH 7.0 に調製) を用いた。活性はペーパーディスク法 (直径 6 mm : アドバンテック社製、日本国) により評価し、24 時間培養後に阻止円を測定した。

その測定結果によれば、K01-0509-A1 物質は $10 \mu\text{g}$ /ディスクで、K01-0509-A2 物質は $10 \mu\text{g}$ /ディスクで全ての検定菌に阻止円を示さなかった。

以上に詳しく述べたように、本発明の K01-0509 物質は、それ自身では抗菌活性を示すことなく、病原性グラム陰性細菌の有する III 型分泌装置を選択的に阻害する新しい抗感染症薬として有用である。

図面の簡単説明

第 1 図は本 K01-0509-A1 物質の紫外吸収スペクトル (水溶液中) を示したものである。

第 2 図は本 K01-0509-A1 物質の赤外吸収スペクトル (臭化カリウム法) を示したものである。

第 3 図は本 K01-0509-A1 物質のプロトン核磁気共鳴スペクトル (重水中) を示したものである。

第 4 図は本 K01-0509-A1 物質のカーボン核磁気共鳴スペクトル (重水中) を示したものである。

第 5 図は本発明の K01-0509-A2 物質の紫外吸収スペクトル (水

溶液中)を示したものである。

第6図は本K01-0509-A2物質の赤外部吸収スペクトル(臭化カリウム法)を示したものである。

第7図は本K01-0509-A2物質のプロトン核磁気共鳴スペクトル(重水中)を示したものである。

第8図は本K01-0509-A2物質のカーボン核磁気共鳴スペクトル(重水中)を示したものである。

発明を実施するための最良の形態

次に、実施例を挙げて本発明を説明するが、本発明はこれのみに限定されるものでない。

寒天斜面培地〔スターチ1.0%、和光純薬社製、日本国）、エヌ・ゼット・アミン0.3%（和光純薬社製、日本国）：肉エキス0.1%（極東製薬社製、日本国）、寒天1.2%（清水食品社製、日本国）、炭酸カルシウム0.3%（関東化学社製、日本国）、pH7.0に調製〕で培養したK01-0509株を、種培地〔スターチ2.4%（和光純薬社製、日本国）、グルコース0.1%（和光純薬社製、日本国）、ペプトン0.3%（極東製薬社製、日本国）、酵母エキス0.5%（オリエンタル酵母社製、日本国）、炭酸カルシウム（関東化学社製、日本国）、pH7.0に調製〕100mLを分注した500mL容三角フラスコに1白金耳ずつ接種し、27℃で3日間ロータリーシェイカー（210rpm）で培養した後、生産培地〔スターチ2.4%（和光純薬社製、日本国）、グルコース0.1%（和光純薬社製、日本国）、ペプトン0.3%（極東製薬社製、日本国）、肉エキス0.3%（極東製薬、日本国）、酵母エキス0.5%（オリエンタル酵母社製、日本国）、炭酸カルシウム0.4%（関東化学社製、日本国）、硫酸鉄・七水和物 $5.0 \times 10^{-4}\%$ （関東化学社製、日本国）、塩化マグネシウム・四水和物 $5.0 \times 10^{-4}\%$ （和光純薬社製、日本国）、硫酸銅・五水和物 $5.0 \times 10^{-4}\%$ （関東化学社製、日本国）、塩化コバルト・六水和物5

、 $0 \times 10^{-4}\%$ （和光純薬社製、日本国）、pH 7.0に調製）20 Lを入れた30 L容ジャーフェンターに1%植菌し、37°Cで4日間培養した。

4日間培養した培養液（54 L）をシャープレス遠心機で遠心して上清と菌体とに分け、上清を活性炭カラム（ $\phi 75 \times 150$ mm、和光純薬社製）にかけ、水1.5 Lで洗浄後、活性成分を20、40%アセトン各1.5 Lで溶出し、減圧下濃縮して凍結乾燥した。得られた粗物質21.5 gを少量の水に溶解してアンバーライトIRC-50（H+）カラム（ $\phi 46 \times 110$ mm、オルガノ社製、日本国）にかけ、水300 mLで洗浄後、活性成分を1N HCl 600 mLで溶出し、中和後、電気透析装置で脱塩し、減圧下濃縮して凍結乾燥した。

得られた粗物質823 mgのうち200 mgを少量の水に溶解し、0.1%トリフルオロ酢酸水溶液で平衡化したODSカラム（ $\phi 10 \times 30$ mm、センシユ科学社製、日本国）にかけ、0.1%トリフルオロ酢酸水溶液10 mLで洗浄後、活性成分を20%メタノール 0.1%トリフルオロ酢酸水溶液5 mLで溶出し、減圧下濃縮して凍結乾燥した。残りの623 mgを同様の操作により分離することで得られた粗物質103 mgを少量の水に溶解し、分取HPLC（カラム：Develosil C30-UG-5、 $\phi 20 \times 250$ mm、野村科学社製、日本国）により精製を行った。8%メタノール 0.1%トリフルオロ酢酸水溶液のアイソクラティックを移動相とし、5 mL/minの流速において、UV 210 nmの吸収をモニターした。保持時間88分に活性を示すピークを観察し、このピークを分取して分取液を減圧濃縮し凍結乾燥した。

得られた活性画分8.3 mgを少量の水に溶解し分取HPLC（カラム：Develosil C30-UG-5、 $\phi 20 \times 250$ mm、野村科学社製、日本国）により精製を行った。3%アセトニトリル 0.05%リン酸水溶液のアイソクラティックを移動相とし、5 mL/minの流速において、UV 210 nmの吸収をモニターした。保持時間27分及び30分に活性を示すピークを観察し、このピークを分散して分取液を減圧下濃縮し、続いて脱塩するために、0.1%トリフルオロ酢酸水溶液で平衡化したODSカラム（ $\phi 5 \times 10$ mm、セン

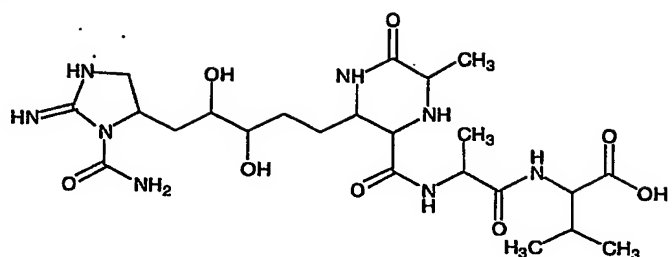
シュー科学社製、日本国) につけ、0. 1 %トリフルオロ酢酸水溶液 5 m L で洗浄後、活性物質を 1 0 0 %メタノール 0. 1 %トリフルオロ酢酸水溶液 5 m L で溶出し、減圧濃縮して凍結乾燥することにより白色粉末状の K 0 1 - 0 5 0 9 - A 1 物質を収量 1. 1 m g、K 0 1 - 0 5 0 9 - A 2 物質を収量 1. 5 m g でそれぞれ単離した。

産業上の利用分野

以上に説明したように、K 0 1 - 0 5 0 9 - A 1 物質および K 0 1 - 0 5 0 9 - A 2 物質を生産する能力を有するストレプトマイセス属に属する K 0 1 - 0 5 0 9 株を代表する微生物を培地に培養して、その培養液中からタイプ I I I 型分泌機構阻害活性を有する K 0 1 - 0 5 0 9 - A 1 物質および K 0 1 - 0 5 0 9 - A 2 物質を採取することにより、タイプ I I I 型分泌装置を有する病原性グラム陰性細菌に選択的で有効な医薬品としての効果が期待される。

請求の範囲

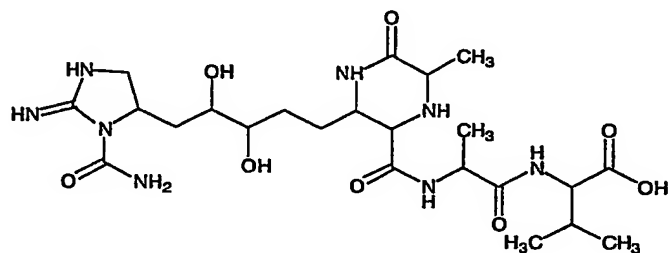
1. 下記式 [I]



[I]

で表される K 0 1 - 0 5 0 9 - A 1 物質。

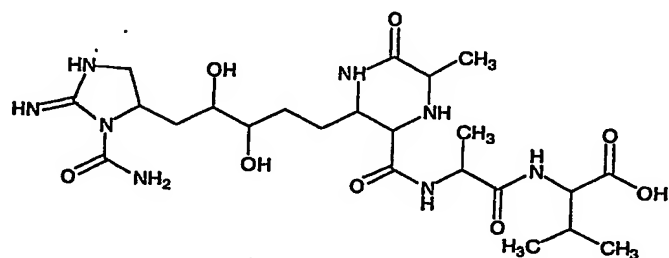
2. 下記式 [I I]



[I I]

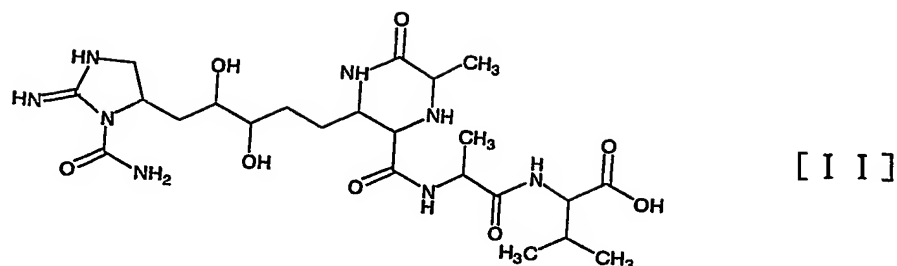
で表される K 0 1 - 0 5 0 9 - A 2 物質 (A 1 物質の立体異性体) 。

3. 特に下記式 [I]



[I]

で表される K 0 1 - 0 5 0 9 - A 1 物質及び／又は特に下記式 [I I]



で表されるK 0 1 - 0 5 0 9 - A 2物質（A 1物質の立体異性体）からなるK 0 1 - 0 5 0 9組成物。

4. ストレプトミセス属に属し、K 0 1 - 0 5 0 9 - A 1物質を生産する能力を有する微生物を培地で培養し、培養液中にK 0 1 - 0 5 0 9 - A 1物質を蓄積せしめ、該培養物からK 0 1 - 0 5 0 9 - A 1物質を採取する請求項1記載のK 0 1 - 0 5 0 9 - A 1物質の製造法。

5. ストレプトミセス属に属し、K 0 1 - 0 5 0 9 - A 2物質を生産する能力を有する微生物を培地で培養し、培養液中にK 0 1 - 0 5 0 9 - A 2物質を蓄積せしめ、該培養物からK 0 1 - 0 5 0 9 - A 2物質を採取する請求項2記載のK 0 1 - 0 5 0 9 - A 2物質の製造法。

6. ストレプトミセス属に属し、K 0 1 - 0 5 0 9 - A 1物質および／またはK 0 1 - 0 5 0 9 - A 2物質を生産する能力を有する微生物を培地で培養し、培養液中にK 0 1 - 0 5 0 9 - A 1物質および／またはK 0 1 - 0 5 0 9 - A 2物質を蓄積せしめ、該培養物からK 0 1 - 0 5 0 9 - A 1物質および／またはK 0 1 - 0 5 0 9 - A 2物質を採取する組成物の製造法。

7. ストレプトミセス属に属し、K 0 1 - 0 5 0 9 - A 1物質を生産する能力を有する微生物が、ストレプトミセス・エスピー K 0 1 - 0 5 0 9 (S t r e p t o m y c e s s p. K 0 1 - 0 5 0 9) F E R M B P - 0 8 5 0 4で

ある請求項 4 記載の K 0 1 - 0 5 0 9 - A 1 物質の製造法。

8. ストレプトミセス属に属し、K 0 1 - 0 5 0 9 - A 2 物質を生産する能力を有する微生物が、ストレプトミセス・エスピー K 0 1 - 0 5 0 9 (S t r e p t o m y c e s s p. K 0 1 - 0 5 0 9) F E R M B P - 0 8 5 0 4 である請求項 5 記載の K 0 1 - 0 5 0 9 - A 2 物質の製造法。

9. ストレプトミセス属に属し、K 0 1 - 0 5 0 9 - A 1 物質および／または K 0 1 - 0 5 0 9 - A 2 物質を生産する能力を有する微生物が、ストレプトミセス エスピー K 0 1 - 0 5 0 9 (S t r e p t o m y c e s s p. K 0 1 - 0 5 0 9) F E R M B P - 0 8 5 0 4 である K 0 1 - 0 5 0 9 - A 1 物質および／または K 0 1 - 0 5 0 9 - A 2 物質からなる請求項 6 記載の組成物の製造法。

10. 微生物がストレプトミセス・エスピー K 0 1 - 0 5 0 9 (S t r e p t o m y c e s s p. K 0 1 - 0 5 0 9) F E R M B P - 0 8 5 0 4。

11. ストレプトミセス・エスピー K 0 1 - 0 5 0 9 (F E R M B P - 0 8 5 0 4) の変異株である請求の範囲 10 記載の微生物。

FIG. 1

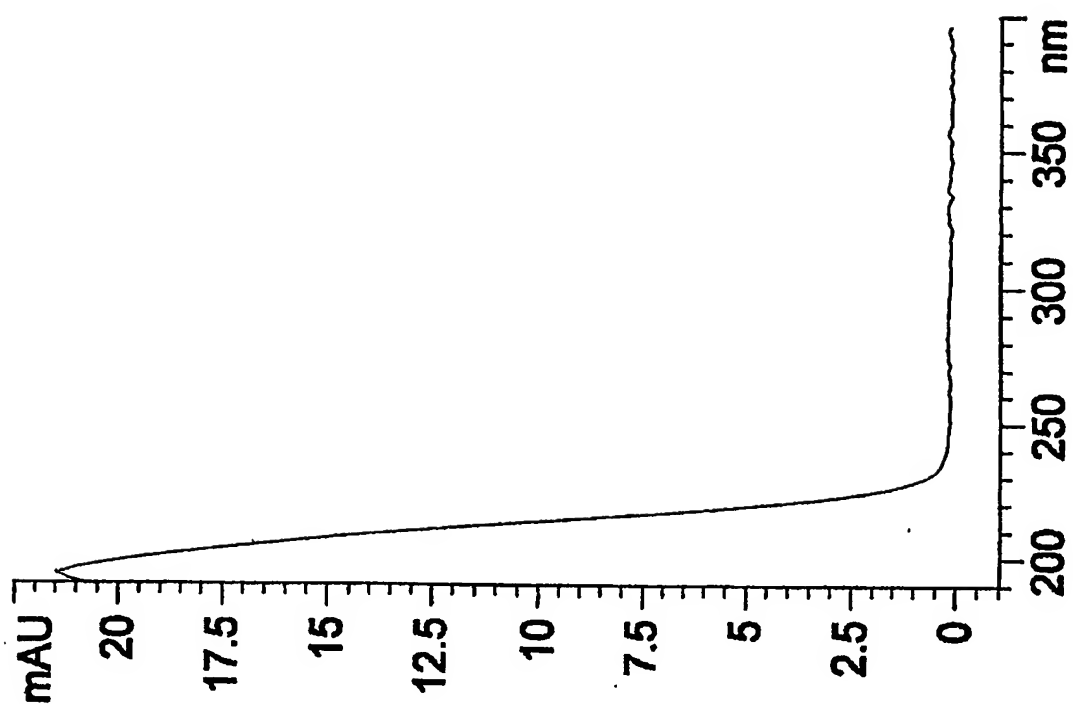
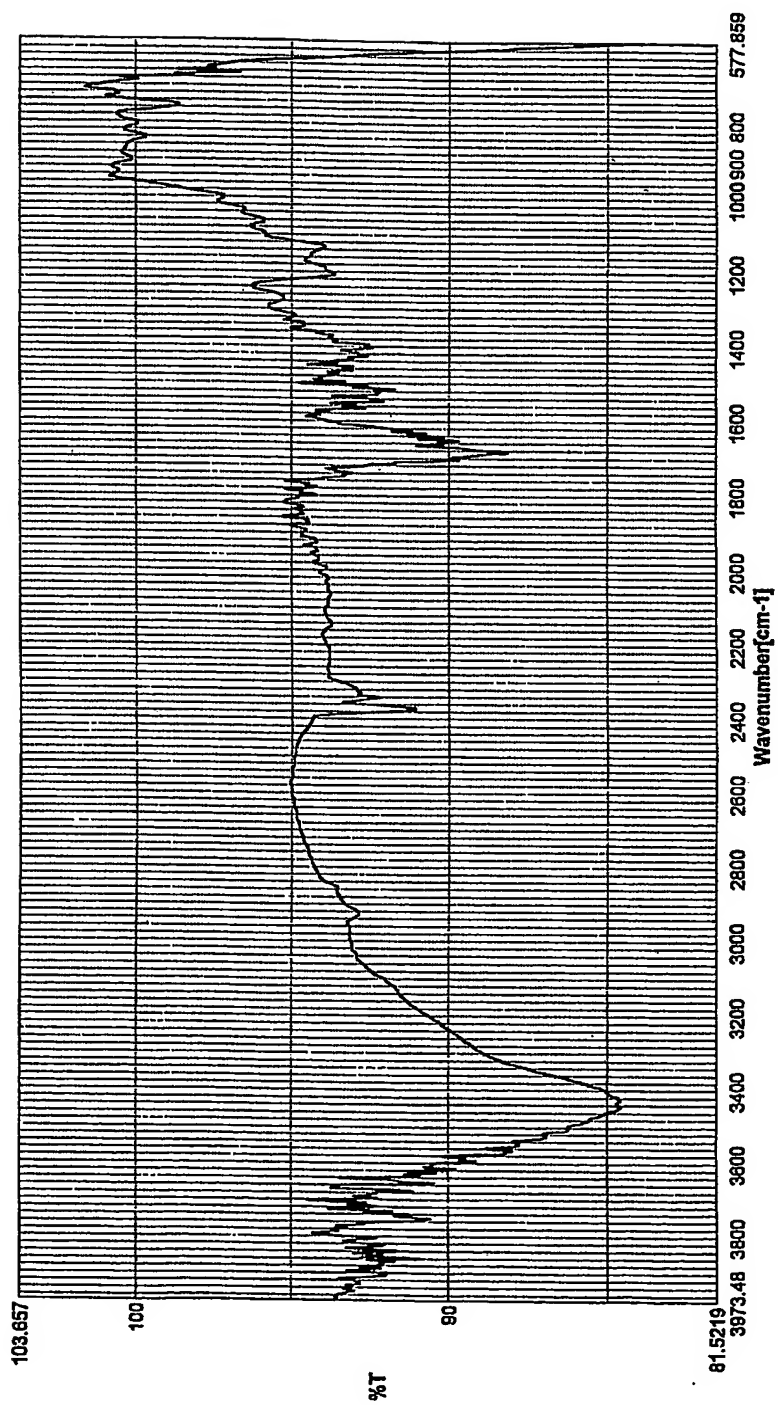


FIG. 2



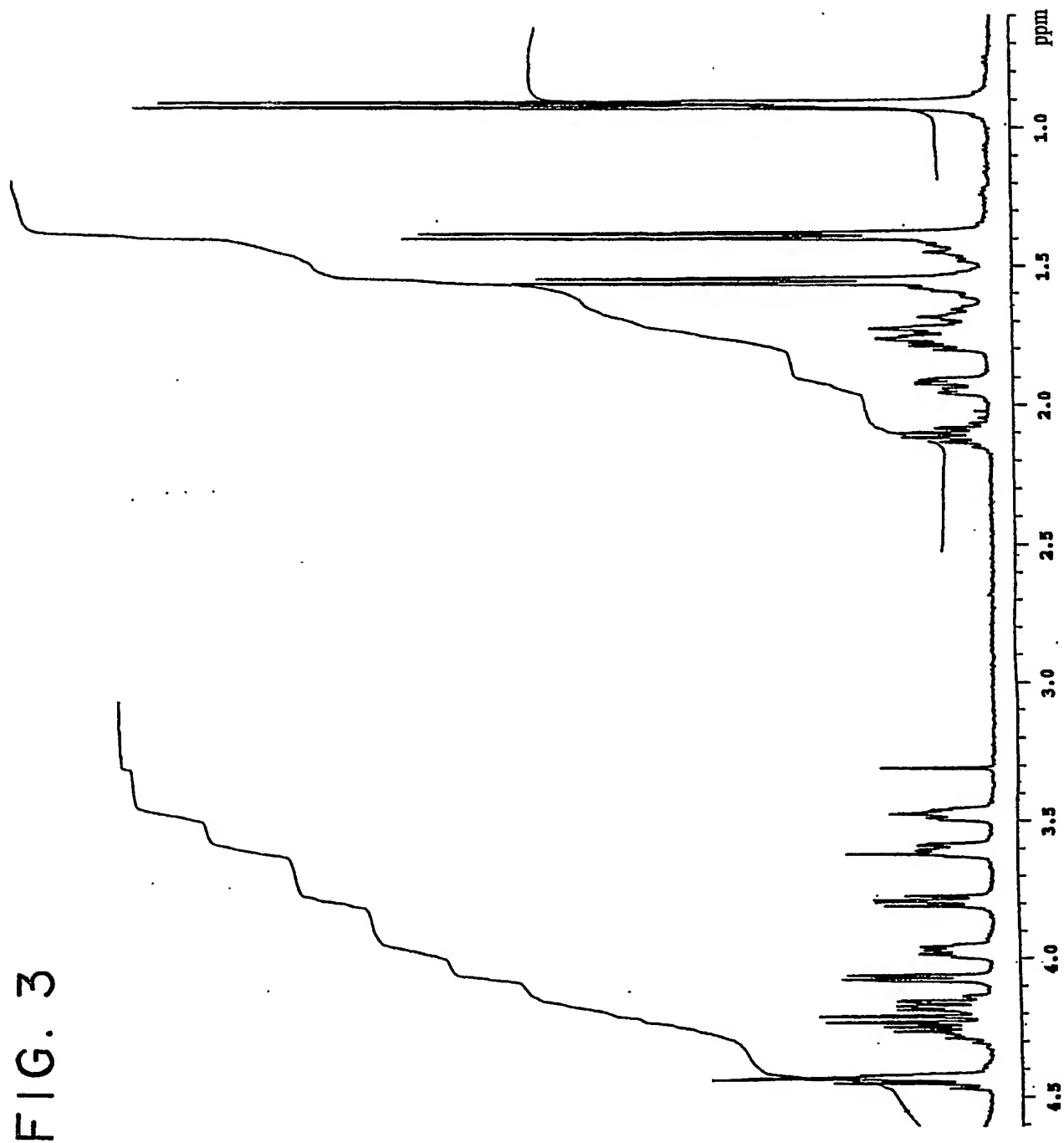


FIG. 3

FIG. 4

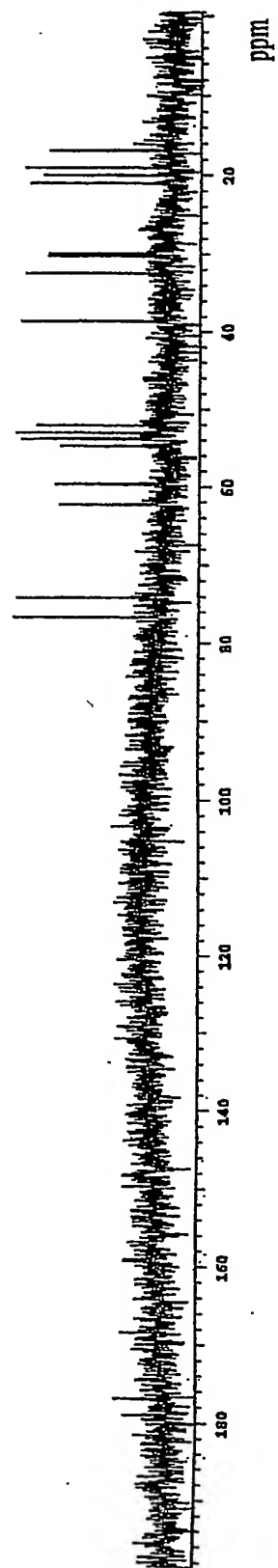


FIG. 5

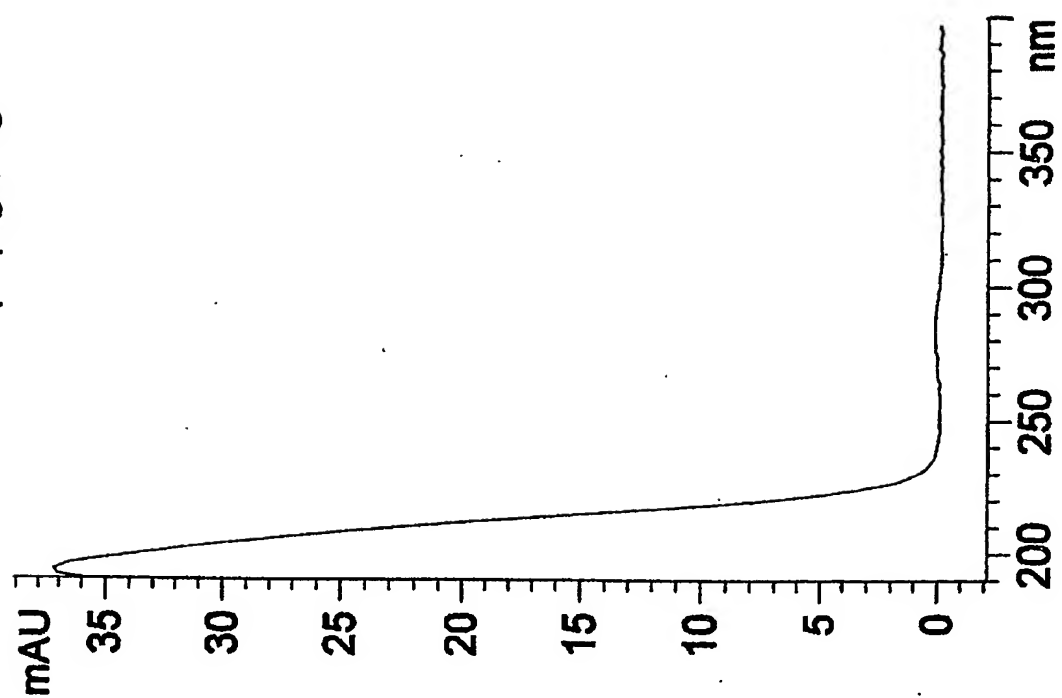


FIG. 6

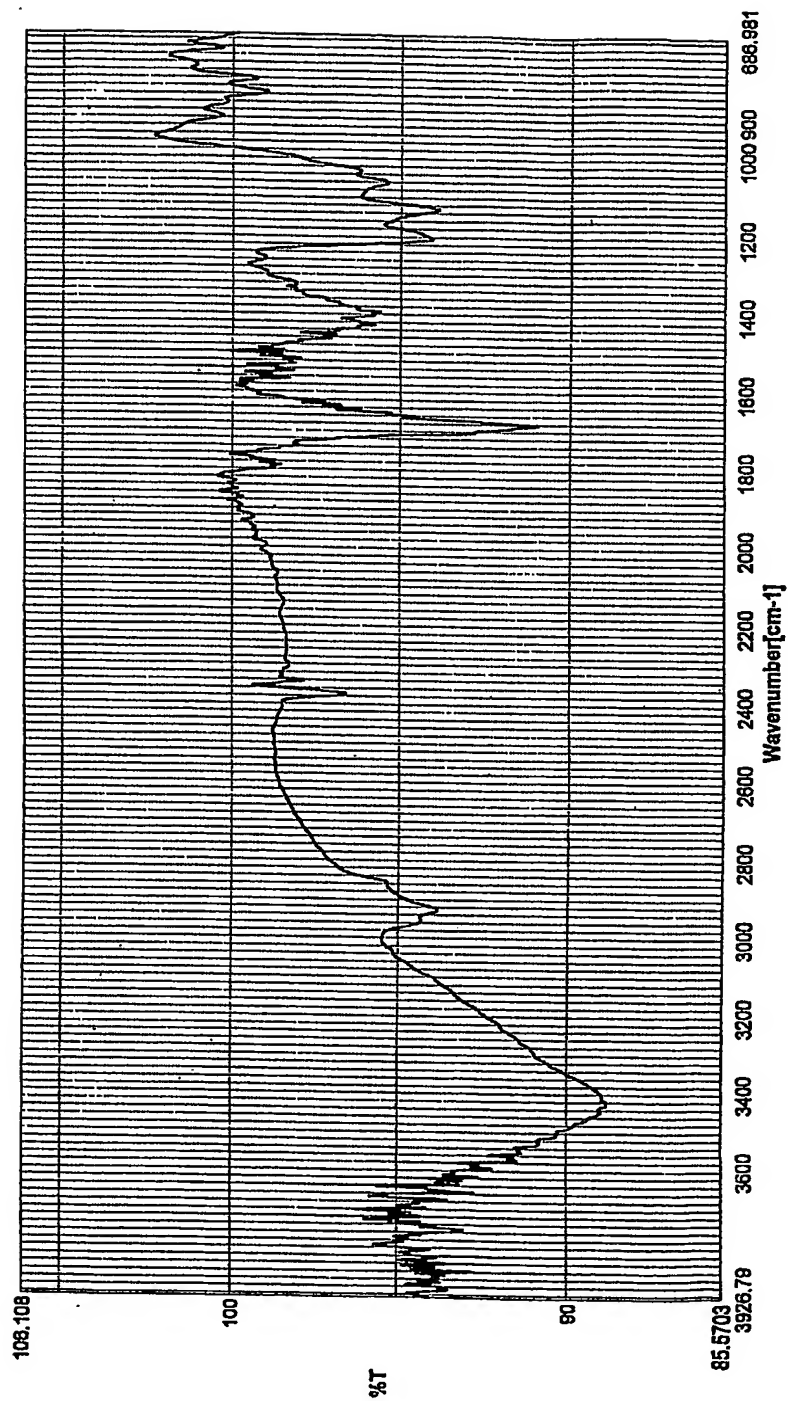


FIG. 7

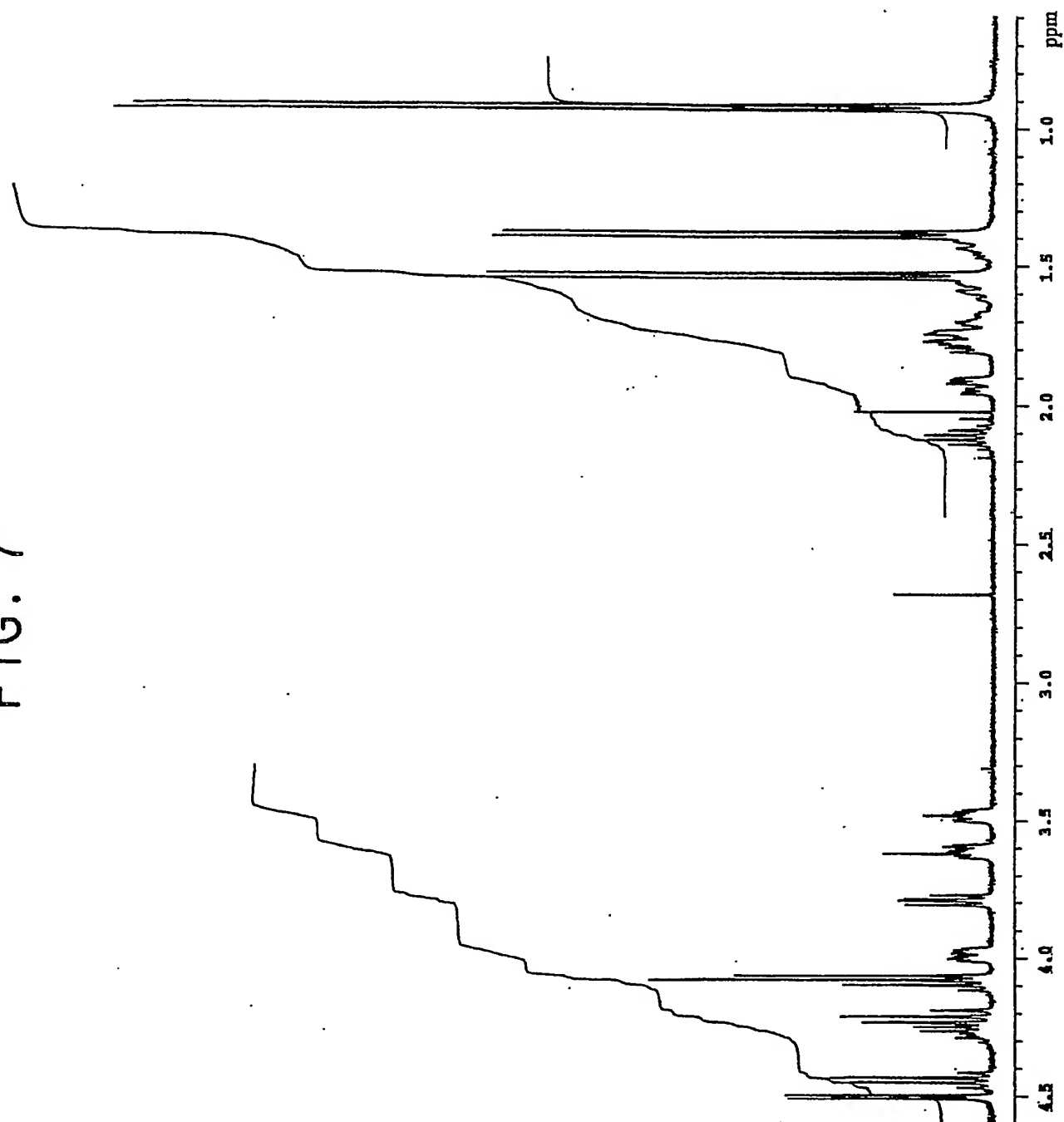
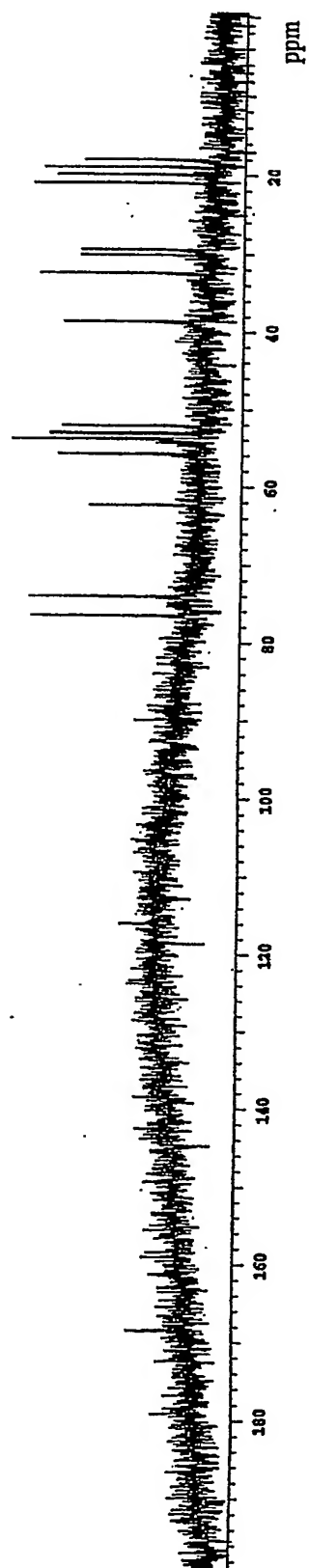


FIG. 8



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/001311

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K5/062, C12P21/02, C12N1/20// (C12P21/02, C12R1:465)
(C12N1/20, C12R1:465)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07K5/062, C12P17/00-17/18, 21/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS/WPI (DIALOG), CAPLUS/REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SHREDER K. et al., "Synthesis of a Constrained Enkephalin Analog to Illustrate a Novel Route to the Piperazinone Ring Structure.", Tetrahedron Lett., 1998, Vol.39, pages 221 to 224	1-11
A	HUECK C.J. et al., "Type III Protein Secretion Systems in Bacterial Pathogens of Animals and Plants.", Microbiol.Mol.Biol.Rev. 1998, Vol.62, No.2, pages 379 to 433	1-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
25 February, 2004 (25.02.04)

Date of mailing of the international search report
09 March, 2004 (09.03.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07K 5/062, C12P 21/02, C12N 1/20 //(C12P 21/02, C12R 1:465) (C12N 1/20, C12R 1:465)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07K 5/062, C12P 17/00-17/18, 21/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/WPI (DIALOG), CAplus/REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する 箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	SHREDER K. et al. Synthesis of a Constrained Enkephalin Analog to Illustrate a Novel Route to the Piperazinone Ring Structure. Tetrahedron Lett. 1998, Vol. 39, p. 221-224	1-11
A	HUECK C. J. et al. Type III Protein Secretion Systems in Bacterial Pathogens of Animals and Plants. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1998, Vol. 62, No. 2, p. 379-433	1-11

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25. 02. 2004

国際調査報告の発送日

09. 3. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区段が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

三原 健治

4N

2937

電話番号 03-3581-1101 内線 3488